

WOJCIECH WITEK
ZAKŁAD BIOLOGII STRUKTURALNEJ EUKARIONTÓW
INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKA AKADEMIA NAUK

BIOLOGIA STRUKTURALNA SZLAKU BIOSYNTETY HISTYDINY U ROŚLIN

W niniejszej rozprawie doktorskiej prezentuję wyniki moich badań enzymów H1SN2, H1SN3, H1SN5 i H1SN6, które katalizują szlak biosyntezy histydyny (SBH) u roślin. Głównymi metodami wykorzystanymi w badaniach były krystalografia rentgenowska i kriomikroskopia elektronowa (cryoEM). Wyniki te były wzbogacone o analizy bioinformatyczne i filogenetyczne, oraz charakteryzację aktywności enzymatycznej. Głównymi celami rozprawy były (i) rozwiązanie trójwymiarowych struktur enzymów SBH, (ii) charakteryzacja ich aktywności enzymatycznej, (iii) opracowanie protokołów do enzymatycznej syntezy *in vitro* substratów, (iv) zaprojektowanie szkieletów molekularnych dla przyszłych inhibitorów, oraz (v) poznanie filogenezy tych enzymów. Struktury H1SN2, H1SN3 i H1SN6 są pierwszymi roślinnymi strukturami tych enzymów.

SBH u roślin składa się z jedenastu reakcji, katalizowanych przez osiem enzymów, nazwanych H1SN1-8, zgodnie z kolejnością ich aktywności w szlaku. Szlak ten jest interesującym obiektem badawczym ze względu na jego połączenie z biosyntezą *de novo* puryn oraz metabolizmem azotu. Alarmująca potrzeba posiadania zrównoważonych źródeł pożywienia oraz bezpieczeństwo gleb, stały się fundamentami tego projektu. Zrozumienie właściwości struktur enzymów biorących udział w SBH u roślin umożliwia rozwój małych cząsteczek, które zachowując się jak inhibitory lub aktywatory, mogą modulować wydajność produkcji histydyny. Histydyna, dzięki właściwościom swojego łańcucha bocznego zawierającego pierścień imidazolowy, jest zdolna do chelatacji kationów metali z gleb i wód, umożliwiając proces fitoremediacji. To może potencjalnie zapewnić bezpieczeństwo gleb i żywności, które powinny być wolne od skażenia metalami, powodującymi np. częste alergie na nikiel. Bezpieczeństwo produktów spożywczych może być zapewnione poprzez zmniejszenie herbicydooporności chwastów, która osłabia wydajność produkcji żywności. Podejścia zastosowane w niniejszej rozprawie poszerzają nasze zrozumienie SBH u roślin, ponieważ tego typu badania u eukariontów były zaniedbywane przez dekady, mimo, że biosynteza histydyny została dobrze poznana u prokariontów.

Opierając się na badaniach prowadzonych przez mojego promotora, Prof. Miłosza Ruszkowskiego, który scharakteryzował strukturalnie i funkcjonalnie enzymy HISN1, HISN7 i HISN8, mogłem badać struktury, aktywność i ewolucję enzymów HISN2, HISN3, HISN5 i HISN6. Jako źródło sekwencji kodujących te enzymy wybrałem modelową roślinę strączkową z rodzaju lucerna o zsekwencjonowanym genomie, *Medicago truncatula* (*Mt*), która jest ważnym środowiskowo i ekonomicznie gatunkiem.

Badania strukturalne zapewniły wgląd w interakcje pomiędzy *Mt*HISN2, a AMP, co pozwoliło na zaktualizowanie mechanizmu reakcji. AMP okazało się być efektywnym inhibitorem *Mt*HISN2, w zakresie stężeń fizjologicznych, sugerując istnienie drugorzędowego mechanizmu regulującego przepływ szlaku. Struktury krystaliczne *Mt*HISN3 z substratem i produktem przyczyniły się do zrozumienia różnic pomiędzy roślinnymi i bakteryjnymi homologami, co umożliwiło rozwój herbicydów specyficznych na poziomie królestwa. Symulacje dynamiki molekularnej fragmentu specyficznego dla roślin sugerowały jego udział w uwalnianiu produktu, co przyczynia się do wysokiej wydajności katalitycznej. Zestaw wysokorozdzielczych struktur krystalicznych i cryoEM enzymu *Mt*HISN5 został wykorzystany do identyfikacji miejsc wiązania ligandów. Wyniki te, połączone z wynikami wirtualnego skriningu posłużyły do zaproponowania nowych cząsteczek-kandydatów oraz łączników dla przyszłych herbicydów. Proces stereospecyficznej syntezy enzymatycznej substratu *Mt*HISN5 poskutkowało opracowaniem nowego protokołu do badania aktywności tego enzymu. Struktury krystaliczne *Mt*HISN6 ujawniły zmiany jego dynamiki, na podstawie interakcji z ligandami. Badania kinetyczne wykazały wysoką selektywność względem substratu, w porównaniu z jego homologami bakteryjnymi. Różnice strukturalne pomiędzy tymi homologami zainspirowały przeprowadzenie kampanii wirtualnego skriningu w regionach o najwyższym prawdopodobieństwie rozwoju herbicydów specyficznych na poziomie królestwa.

Analizy filogenetyczne przeprowadzone z użyciem sieci podobieństwa sekwencyjnego oraz drzew filogenetycznych enzymów SBH wygenerowały interesujące wyniki na temat ich pochodzenia. W tej grupie enzymów, jedynie HISN5 pochodzi od cyjanobakterii, co jest wynikiem zgodnym z teorią endosymbiozy. Geny kodujące pozostałe enzymy, czyli HISN2, HISN3 i HISN6, były najprawdopodobniej pozyskane wcześniej w toku ewolucji, na drodze horyzontalnego transferu genów odpowiednio od Myxococcota, Bacillota i Chloroflexota.